

PCT/FR 2004 / 050289
28 JUIN 2004

BREVET D'INVENTION

13 SEP 2004

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

27 MAI 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITE

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: 27.06.2003 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: 0350270 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: 75 DATE DE DÉPÔT: 27.06.2003	Jean LEHU BREVATOME 3, rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS France
Vos références pour ce dossier: B 14352.3 DB DD2521	

1 NATURE DE LA DEMANDE			
Demande de brevet			
2 TITRE DE L'INVENTION			
PROCÉDE ET DISPOSITIF DE DOSAGE D'UN ÉCHANTILLON BIOLOGIQUE OU CHIMIQUE			
3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE		Pays ou organisation	Date N°
4-1 DEMANDEUR			
Nom	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE		
Rue	31-33, rue de la Fédération		
Code postal et ville	75752 PARIS 15ème		
Pays	France		
Nationalité	France		
Forme juridique	Etablissement Public de Caractère Scientifique, technique et Ind		
5A MANDATAIRE			
Nom	LEHU		
Prénom	Jean		
Qualité	Liste spéciale: 422-5 S/002, Pouvoir général: 7068		
Cabinet ou Société	BREVATOME		
Rue	3, rue du Docteur Lancereaux		
Code postal et ville	75008 PARIS		
N° de téléphone	01 53 83 94 00		
N° de télécopie	01 45 63 83 33		
Courrier électronique	brevets.patents@brevalex.com		
6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS		Fichier électronique	Pages
Texte du brevet		textebrevet.pdf	26
Dessins		dessins.pdf	4
Désignation d'inventeurs		D 21, R 4, AB 1	
Pouvoir général		page 4, figures 10, Abrégé: page 1, Fig.1	

7 MODE DE PAIEMENT				
Mode de paiement		Prélèvement du compte courant		
Numéro du compte client		024		
8 RAPPORT DE RECHERCHE				
Etablissement immédiat				
9 REDEVANCES JOINTES				
	Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt	EURO	0.00	1.00	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)	EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème	EURO	15.00	6.00	90.00
Total à acquitter	EURO			410.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Signé par

Signataire: FR, Brevatome, J.Lehu

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

Réception électronique d'une soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet : X

Demande de CU :

DATE DE RECEPTION	27 juin 2003	
TYPE DE DEPOT	INPI (PARIS) - Dépôt électronique	Dépôt en ligne: X
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI	0350270	Dépôt sur support CD:
Vos références pour ce dossier	B 14352.3 DB DD2521	

DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
Nombre de demandeur(s)	1
Pays	FR

TITRE DE L'INVENTION

PROCEDE ET DISPOSITIF DE DOSAGE D'UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE OU CHIMIQUE

DOCUMENTS ENVOYES

package-data.xml	Requetefr.PDF	fee-sheet.xml
Design.PDF	ValidLog.PDF	textebrevet.pdf
FR-office-specific-info.xml	application-body.xml	request.xml
dessins.pdf	indication-bio-deposit.xml	

EFFECTUE PAR

Effectué par:	J.Lehu
Date et heure de réception électronique:	27 juin 2003 15:54:43
Empreinte officielle du dépôt	88:50:DC:43:11:84:3C:A2:5C:D4:CB:C2:F0:78:D6:F8:1C:EC:C8:B9

/ INPI PARIS, Section Dépôt /

SIEGE SOCIAL
INSTITUT 28 bis, rue de Saint Petersburg
NATIONAL DE 75800 PARIS cedex 08
LA PROPRIETE Téléphone : 01 53 04 53 04
INDUSTRIELLE Télécopie : 01 42 93 59 30

**PROCEDE ET DISPOSITIF DE DOSAGE D'UN ECHANTILLON
BIOLOGIQUE OU CHIMIQUE**

DESCRIPTION

5 DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention concerne un procédé et un dispositif de dosage d'un échantillon biologique ou chimique.

10 Le domaine de l'invention est notamment celui des mesures de concentration de molécules fluorescentes appelées fluorochromes contenues dans des solutions. De telles molécules sont utilisées pour doser la quantité d'une espèce biologique donnée. La quantité de molécules de cette espèce biologique est
15 alors liée à la quantité de molécules fluorescentes. Une mesure de l'intensité émise lors de l'excitation de ces molécules fluorescentes permet, par calibrage de l'appareil de mesure utilisé, de déduire la quantité ou la concentration de molécules biologiques. De telles
20 mesures sont couramment utilisées en biologie, en chimie et en physique.

Dans la suite de la description, pour des raisons de simplification d'exposé, l'invention est décrite dans ce domaine de mesures de fluorescence
25 d'échantillons.

ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

De nombreux appareils de commerce, tels que les fluorimètres et les spectro-fluorimètres,
30 permettent de mesurer la fluorescence d'une solution.

Ces appareils permettent d'effectuer une mesure dans une cuve dont la géométrie est variable et fonction de l'application.

5 D'autres appareils de mesure en solution utilisent des capillaires comme cuve. Ce sont par exemple les systèmes de mesures pour appareil d'électrophorèse.

10 Dans tous ces appareils on mesure un échantillon placé dans une cuve, auquel on associe un détecteur unique.

15 Dans certaines applications de spectrofluorimétrie on utilise des détecteurs multiples. Le spectre d'émission des molécules fluorescentes est alors dispersé sur un capteur d'image afin de mesurer simultanément l'énergie dans toutes les longueurs d'onde, ce qui revient à associer un détecteur unique pour chaque intervalle spectral. Plusieurs pixels sont parfois associés dans la direction orthogonale à celle de la dispersion afin de réaliser une opération appelée
20 « binning » qui permet d'augmenter le rapport signal sur bruit de chaque mesure spectrale en réduisant le bruit de lecture des détecteurs devant le flux de photons. Des détecteurs multiples sont également utilisés dans certains appareils multi-échantillons. La
25 présence de plusieurs échantillons impose alors l'emploi de plusieurs cuves et la mesure pour chaque échantillon est faite via un capteur d'image.

30 La sensibilité de détection de tels appareils est insuffisante pour doser de faibles quantités de molécules, typiquement de l'ordre du picoMolaire, soit pour faire un diagnostic de maladie,

soit pour étudier la pureté d'une solution. Certains types de dosages sont même impossibles à faire en dessous d'une certaine concentration : dans le domaine des immuno-analyses (dosage des antigènes), le seuil de
5 détection statistique de l'art connu, exprimé en concentration de cibles, le plus bas obtenu pour une mesure en solution est de l'ordre de la centaine de picoMolaire. Typiquement, les appareils de commerce en cuve ne permettent pas de mesurer une fluorescence en
10 dessous d'une concentration de cibles de 1nM (nanoMolaire).

Pour diminuer la limite de détection on peut focaliser la lumière d'une source laser dans un très petit volume, comme cela est réalisé en
15 électrophorèse capillaire. L'échantillon passe alors dans un capillaire de quelques centaines de micromètres de diamètre. La limite de détection obtenue est de l'ordre du nM, comme décrit dans le document référencé [1] en fin de description.

20 On retrouve une telle limite de détection en marqueurs dans un système complexe comportant une optique confocale intégrée scrutant l'intérieur d'un capillaire, comme décrit dans le document référencé [2].

25 Les systèmes de mesure utilisant des capillaires ne permettent pas un débit d'échantillon très grand, par exemple d'une dizaine à une centaine de microlitre/minute. Une mesure sur un échantillon de grand volume est donc impossible. Le prélèvement qui
30 s'ensuit réduit l'échantillonnage moléculaire et augmente le seuil de détection. Par exemple, s'il est

possible de détecter la présence d'une molécule unique par des techniques de corrélation de fluorescence, comme décrit dans document référencé [3], le volume sondé est très faible, de l'ordre du femtolitre.

- 5 Détecter une molécule dans un tel volume donne une limite de détection de l'ordre du nM.

Pour augmenter la densité de puissance dans le volume excité on peut focaliser la lumière d'excitation. Comme l'émission de fluorescence est
10 quasi proportionnelle à la quantité d'énergie reçue lors de l'excitation, l'augmentation de la densité de puissance permet d'augmenter le nombre de photons émis en fluorescence. Pour un système de mesure bien conçu, comme c'est le cas de la plupart des instruments du
15 commerce, plus le nombre de photons mesurés est grand et plus l'incertitude relative de cette mesure est faible. Cette incertitude varie comme $1/\sqrt{N}$ où N est le nombre de photons transformés en électrons lors de la conversion par le détecteur. Ceci justifie le choix
20 d'une augmentation de la densité de puissance dans le volume excité. Cependant, une forte densité de puissance s'accompagne d'une photo-extinction d'autant plus rapide que l'énergie lumineuse est grande. Pour la mesure d'une très faible concentration de molécules
25 fluorescentes, il faut alors exposer ce volume pendant un temps supérieur au temps de photo-blanchiment, qui correspond à une propriété des molécules fluorescentes consistant à s'arrêter d'émettre de la lumière au bout d'un certain temps. Il est alors impossible de
30 collecter suffisamment de photons pour atteindre le seuil de détection requis.

Des facteurs de limitation du seuil de détection résident dans l'auto-fluorescence des liquides, qui est une fluorescence intrinsèque de ces milieux, et dans la diffusion Raman. Le niveau de lumière émis réduit, en effet, les performances de détection car l'« offset » de photoluminescence du tampon utilisé est de même nature que le signal, dit « spécifique », que l'on veut détecter. Si le système de mesure est seulement limité par le « bruit de grenaille », dit également « bruit de photons », alors le plus petit signal mesurable au sens statistique S_{\min} est égal à $3x\sqrt{\text{Offset}}$, où « Offset » est une mesure exprimée en électrons primaires (électrons résultants directement de la conversion des photons par une photocathode dans le cas d'un photomultiplicateur ou d'une surface semi-conductrice) et 3 est un facteur arbitraire qui permet de garantir une discrimination à 99% entre S_{\min} et Offset. Pour résoudre un tel problème les solutions de l'art connu réalisent :

- 1) un choix judicieux des liquides,
- 2) un choix du marqueur,
- 3) une augmentation du temps de mesure pour accumuler des photons,
- 4) une augmentation de la puissance d'excitation pour collecter plus de photons.

Mais le principal facteur de limitation du seuil de détection est la non-reproductibilité des mesures, qui, pour de faibles niveaux de signaux, devient très vite dominante. Cette non reproductibilité provient essentiellement d'un mauvais repositionnement mécanique de la cuve de mesure et de la lumière qui est

collectée par le ménisque liquide dans cette cuve et qui est dirigée dans l'espace de façon aléatoire.

Une solution pour réduire de telles non-reproductibilités consiste à réaliser l'injection dans la cuve d'un plus grand volume de solution. Mais une telle injection est insuffisante pour obtenir une bonne sensibilité. De plus il n'est pas toujours possible ou souhaitable de travailler avec des grands volumes.

Le positionnement mécanique n'est pas améliorable facilement. De plus dans une telle solution on ne traite pas, alors, des variations provoquées, par exemple, par l'éclairage ambiant et la variation de la forme du ménisque.

Une autre solution pour réduire de telles non-reproductibilités consiste à utiliser des cuves comprenant une fenêtre transparente en verre « noir », qui correspond à la zone considérée pour la mesure. Mais cette solution réduit le flux de photons collecté par le système de mesure, et donc élève la limite de détection. De plus, elle ne permet pas de connaître les variations de l'« offset », qui peuvent être causées par une modification de la lumière ambiante, par un mauvais état de surface des faces de la cuve (salissures, rayures etc.), par une diffusion provenant du ménisque et des parois.

Ainsi ces différentes solutions de l'art connu ne permettent ni une bonne sensibilité, ni une bonne reproductibilité des mesures.

L'invention a pour objet de pallier ces inconvénients en proposant un nouveau procédé et un nouveau dispositif de dosage d'un échantillon

biologique ou chimique qui utilise un dispositif d'enregistrement spatial de l'image de l'interaction entre la lumière issue d'une source et de cet échantillon comme moyen pour sélectionner les informations utiles.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

L'invention concerne un procédé de dosage d'un échantillon biologique ou chimique, comportant les étapes suivantes :

- 10 - introduction éventuelle de l'échantillon dans une cuve dont toutes les faces sont transparentes,
- éclairage de l'échantillon au moyen d'un faisceau lumineux issu d'une source, caractérisé en ce qu'il comporte, en outre,
- 15 les étapes suivantes :
 - réalisation d'une image comprenant l'image de la lumière diffusée par l'échantillon,
 - analyse de l'image selon des critères de référence,
 - 20 - extraction d'une information spécifique à l'interaction faisceau lumineux/échantillon,
 - calcul du dosage.

Dans ce procédé la diffusion peut être une diffusion Raman, une diffusion par fluorescence, une diffusion moléculaire ou particulaire. L'analyse peut consister en l'étude de la structure spatiale de l'image et de la distribution de l'énergie lumineuse dans cette image. Le calcul du dosage peut se faire par rapport à un étalonnage entre la mesure d'énergie lumineuse et la concentration ou la quantité d'échantillon. Le calcul du dosage peut également se

faire par rapport à l'analyse de la cinétique de la réaction biologique ou chimique.

Dans ce procédé, avantageusement, on définit une première zone d'intérêt autour de la zone de volume excité, et une seconde zone d'intérêt disposée à côté de cette première zone, et on mesure le signal spécifique en réalisant la soustraction entre la somme de tous les pixels de la première zone et la somme de tous les pixels de la seconde zone.

L'invention concerne également un dispositif de dosage d'un échantillon biologique ou chimique comportant une cuve dont toutes les faces sont transparentes contenant ledit échantillon éclairé par un faisceau lumineux issu d'une source, des moyens optiques délivrant un signal-image de l'interaction faisceau lumineux/échantillon, un dispositif d'enregistrement de la structure spatiale de cette image, des moyens de traitement aptes à filtrer cette image.

Dans ce dispositif la section de la cuve peut être rectangulaire, carrée, cylindrique ou elliptique. La source de lumière peut être un laser à gaz, un laser solide, une diode laser, une diode électroluminescente, une diode organique ou une lampe spectrale qui peut être une lampe halogène, à mercure, à xénon ou à deutérium. Le dispositif d'enregistrement peut être une caméra CCD ou un système à balayage. Les moyens optiques peuvent comprendre un système d'objectif muni d'un filtre d'arrêt. Le dispositif d'enregistrement peut comporter un mono-détecteur associé à une matrice de pixels à transparence

programmable. Le dispositif d'enregistrement peut comporter deux détecteurs mono-pixel, qui observent chacun une région d'intérêt.

5 L'invention présente les avantages suivants :

- Elle permet d'atteindre une limite de détection expérimentale beaucoup plus faible que celle des systèmes conventionnels.

10 - Elle permet de réaliser un dosage en utilisant un grand volume de solution avec un grand débit, et donc d'envisager des applications comme une analyse des eaux de rivière, des systèmes d'aération dans des immeubles.

15 - Elle n'impose pas de focaliser la lumière dans un petit volume. Le photo-blanchiment des molécules fluorescentes est donc très faible.

20 - Elle permet, du fait de la géométrie de la cuve, d'exciter simultanément un grand nombre de molécules, ce qui permet de collecter de nombreux photons.

25 - Ni l'auto-fluorescence, ni la diffusion Raman du milieu liquide ne sont une limitation à la sensibilité de l'invention. Elle permet donc de travailler avec tous les marqueurs du commerce, ce qui réduit les contraintes de marquage.

30 - Les non-reproductibilités dues à la mécanique de la cuve, le nettoyage ou l'altération de faces optiques de la cuve, et la présence d'artefacts (bulles, poussières) ne sont plus une contrainte. L'invention permet, par analyse d'image, de les réduire

voire de les supprimer. Un décalage de la position de la cuve devant le système de mesure de l'invention ou une translation de la lumière d'excitation du milieu peut être totalement corrigé après mesure de la position de la trace fluorescente dans l'image enregistrée. De même, des poussières présentes dans le volume excité, qui pourraient modifier de façon significative la mesure, sont de petite taille devant le volume excité, et peuvent ainsi être repérées et retirées de la mesure sans perdre celle-ci, ce qui est impossible à réaliser avec un mono-détecteur. En cas d'altération des faces optiques de la cuve, qui peut entraîner une modification de la quantité de lumière qui excite effectivement l'échantillon, l'invention permet de connaître les variations de la puissance effective et de corriger la mesure.

- Les variations de lumière ambiante causées soit par l'échantillon soit par l'environnement sont compensées, par une mesure dans l'image, puis un retrait des « offsets » possibles.

- L'analyse de l'information dans une image peut être conduite à partir d'éléments déterminés à l'avance (fonction d'éclairement, positions prédéterminées des différentes zones utiles), ou de façon dynamique pour faire face à des perturbations aléatoires et/ou imprévues par application de méthodes de traitement des images (maximisation de l'entropie, réseau de neurones).

- La dynamique de dosage de l'invention, qui, pour un certain type de mesures, permet d'atteindre expérimentalement une dynamique de dosage

biologique de 2 200, est très supérieure à celle de l'art connu, qui, pour un même type de mesures, est comprise typiquement entre 5 et 10.

L'invention est applicable dans de nombreux domaines, et notamment :

- dans tous les domaines où il est utile de faire la mesure d'une solution fluorescente,
- en biologie, plus particulièrement pour le dosage de molécules biologiques ou d'intérêt biologique : antigènes, anticorps, peptides, ADN, cellules, bactéries..., pour le diagnostic clinique,
- en chimie (dosage),
- en pharmacie : dosage d'activité, contamination...,
- en physique : recherche de traces de produits, fluidique, analyse de mélange...

BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

La figure 1 illustre une vue de dessus d'un premier mode de réalisation du dispositif de l'invention.

Les figures 2 et 3 illustrent une image de la cuve obtenue avec le dispositif d'enregistrement d'image représenté sur la figure 1.

Les figures 4 à 6 illustrent un second mode de réalisation du dispositif de l'invention.

La figure 7 illustre un troisième mode de réalisation du dispositif de l'invention.

Les figures 8 à 10 illustrent trois exemples de réalisation du dispositif de l'invention.

EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS

Le procédé de l'invention est un procédé de dosage (mesure d'une concentration ou d'une quantité) d'un échantillon biologique ou d'intérêt biologique (antigènes, anticorps, peptides, ADN, cellules, bactéries, toxines) ou chimique (solvant, gaz dissous, formulation, activité chimique), qui peut être un solide, un liquide, un gel...

Dans un premier mode de réalisation illustré sur la figure 1, un échantillon 10 est éclairé par un faisceau lumineux 17 issu d'une source 11 accordée avec le fluorochrome employé. On peut utiliser par exemple un laser Argon 488 nm pour de la fluorescéine ou un laser Hélium-Néon à 633 nm pour du Cy5. L'échantillon 10 est placé dans une cuve 12, par exemple de section rectangulaire dont toutes les faces sont transparentes. La section de cette cuve 12 peut, en effet, être rectangulaire, carrée, cylindrique ou elliptique. Un système d'objectif 13, équipé d'un filtre d'arrêt 14, est monté devant un dispositif d'enregistrement de la structure spatiale d'une image 15, par exemple une caméra CCD ou un système à balayage, relié à un organe de traitement 16. Le dispositif 15 qui reçoit le faisceau 18 diffusé par l'échantillon 10, permet l'enregistrement d'une image de laquelle peut être extraite un signal spécifique de mesure.

Le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes :

- éclairage de l'échantillon 10 au moyen du faisceau lumineux 17 issu de la source 11, qui peut

être un laser à gaz, un laser solide, une diode laser, une diode électroluminescente, une diode organique, une lampe spectrale comme une lampe halogène, à mercure, à xénon, à deutérium,

5 - réalisation d'une image du faisceau lumineux 18 diffusé par l'échantillon 10, l'origine de la diffusion pouvant être une diffusion Raman, une diffusion par fluorescence, une diffusion moléculaire (diffusion Rayleigh) ou particulaire (utilisation de
10 nano-particules),

 - analyse de l'image par rapport à des références, cette analyse consistant alors en l'étude de la structure spatiale de l'image et de la distribution de l'énergie lumineuse dans cette image,
15 ces références étant constituées, par exemple, par l'expérience d'un utilisateur ou par des critères morphologiques (forme et position d'une trace lumineuse), photométrique (fréquences des variations spatiales de la lumière dans l'image), statistiques
20 (variation d'estimateurs de mesures, d'entropie dans l'image),

 - extraction de l'information spécifique à l'interaction entre le faisceau 17 et l'échantillon 10, cette extraction consistant, par exemple, en des
25 opérations arithmétiques entre l'image et d'autres images ou des constantes (par exemple, des soustractions, additions, divisions, multiplications), morphologiques (érosion, dilatation, binarisation, détourage, segmentations, correction de décalage) ou
30 photométriques (corrections polynomiales, convolutions, filtres, seuillages),

- calcul du dosage, ce calcul se faisant par rapport à un étalonnage entre la mesure d'énergie lumineuse et la concentration ou la quantité de l'échantillon biologique ou chimique. Ce calcul peut
5 aussi être effectué en enregistrant la cinétique de la réaction biologique ou chimique et en analysant cette cinétique par des méthodes connues de l'homme de l'art.

Dans le procédé de l'invention la mesure est faite dans une image obtenue par le dispositif
10 d'enregistrement de la structure spatiale d'une image 15. L'invention ne réside pas dans l'emploi d'un tel dispositif 15 mais principalement dans :

- le fait d'enregistrer le faisceau 18 diffusé par l'échantillon 10 sous la forme d'une image,
- 15 - le fait d'extraire l'information de cette image,
- le côté adaptatif obtenu par l'application d'une analyse de l'image.

La figure 2 illustre l'image de la cuve 12
20 obtenue avec le dispositif d'enregistrement de la structure spatiale d'une image 15. La cuve peut avoir des dimensions plus petites que celles de l'image. Elle peut par exemple être remplacée par un ou plusieurs capillaires.

25 De plus, le faisceau lumineux peut être indifféremment plus petit ou plus grand que la cuve.

Dans cette image on peut distinguer plusieurs zones :

- une zone 20 de volume éclairé, qui
30 correspond au volume de la cuve 12 excité par le faisceau 17,

- la zone 21 d'entrée de ce faisceau 17 dans la cuve 12,

- la zone 22 de sortie de ce faisceau 17 de la cuve 12,

5

- une zone 23 de ménisque,

- une zone 24 d'artefact.

On peut ainsi, comme illustré sur la figure 3, définir une première région d'intérêt 25 autour de la zone 20 de volume éclairé et une deuxième région d'intérêt 26 disposée à côté de cette zone 25. La mesure du signal spécifique est alors donné par le calcul : $\Sigma RI_1 - \Sigma RI_2$; c'est-à-dire la soustraction entre la somme de tous les pixels de la première région d'intérêt 25 et la somme de tous les pixels de la seconde région d'intérêt 26.

Sur la figure 3 les deux régions d'intérêt 25 et 26 ont la même taille, ce qui n'est pas indispensable. Lorsque ces régions n'ont pas la même taille, il suffit soit de réaliser un moyennage des niveaux de gris de chaque région, soit une pondération des valeurs par le nombre de pixels.

L'analyse de l'image ainsi représentée conduit à certaines observations :

- La trace fluorescente du faisceau lumineux (zone 20) donne le signal spécifique.

- Le ménisque (zone 23), délimitant le liquide de l'air, est fortement lumineux. Son origine provient de ladite trace. La forme de ce ménisque est fortement aléatoire. L'amplitude du signal provenant de ce ménisque est donc très variable.

- Un artefact (zone 24) peut être, pour un montage donné, une rondelle ressort destinée à assurer un bon positionnement mécanique de la cuve 12.

- Les zones 21 et 22 correspondent
5 respectivement aux points d'entrée et de sortie du faisceau lumineux dans la cuve 12.

Avec un autre réglage des seuils d'affichage, on peut mieux mettre en évidence les niveaux de lumière les plus faibles.

10 Le procédé de l'invention permet d'améliorer le coefficient de variation CV (écart type/moyenne). En effet le coefficient CV obtenu avec le procédé de l'invention est bien inférieur au
15 coefficient CV calculé en faisant la somme de tous les pixels d'une caméra CCD, qui correspond à une mesure faite avec un mono-détecteur. Le coefficient CV obtenu avec le procédé de l'invention est d'ailleurs du même ordre de grandeur que celui obtenu avec un grand volume
20 de solution, comme envisagé précédemment dans l'introduction de ladite demande. Ce coefficient CV obtenu avec le procédé de l'invention est plus faible que celui obtenu par la mesure dans chacune des zones d'intérêt 25 et 26. La soustraction des mesures effectuées dans ces deux zones d'intérêt permet de
25 corriger des variations d'éclairage qui affectent toutes les régions. L'invention permet d'effectuer ainsi un filtrage spatial dans le plan qui permet d'extraire le signal contenant l'information spécifique du phénomène de fluorescence. De plus l'invention
30 permet d'extraire les régions d'intérêt qui sont vraiment pertinentes dans une image ou une pseudo-

image, alors qu'un système de mesure utilisant un seul détecteur mono-pixel ne peut pas réaliser une telle fonction.

Dans un second mode de réalisation, un
5 mono-détecteur associé à une matrice de pixels à
transparence programmable 30 telle qu'une matrice de
cristaux liquides ou de micro-miroirs ou tout autre
système équivalent est disposé devant la cuve 12
illustrée sur la figure 4. Cette matrice 30 est
10 intercalée entre la cuve 12 et le détecteur via un
système de formation des images ou non. On réalise
alors une première mesure en « ouvrant » les pixels
correspondant à la première zone d'intérêt 25, comme
illustré sur la figure 5, puis une deuxième mesure en
15 ouvrant les pixels correspondant à la seconde zone
d'intérêt 26, comme illustré sur la figure 6.

L'emploi d'une telle matrice 30 à
transparence variable permet d'éviter l'enregistrement
systématique d'une image, en réalisant par exemple les
20 étapes suivantes :

- enregistrement de l'image du faisceau
diffusé par l'ouverture/fermeture successives de tous
les pixels de la matrice 30 en synchronisation avec la
mesure effectuée par le mono-détecteur,
- 25 - analyse de l'image et définition de la ou
des zones d'intérêt permettant d'extraire l'information
spécifique,
- enregistrement de tels paramètres pour
une utilisation ultérieure,
- 30 - lors de l'analyse d'un échantillon donné,
ouvertures successives des régions définies lors de

l'étape d'analyse et enregistrement des résultats de mesures pour chacune de ces zones,

- extraction de l'information utile,
- calcul du dosage.

5 Dans un troisième mode de réalisation illustré sur la figure 7, deux détecteurs mono-pixel 35 et 36 observent chacun une région d'intérêt 25 ou 26. Deux moyens de formation d'image 37 et 38 sont placés respectivement devant chacun de ces deux détecteurs 35
10 et 36. La mesure du signal provenant de la première région d'intérêt 25 est faite avec le détecteur 35, celle pour la seconde région d'intérêt 26 est faite avec le détecteur 36. La zone 39 représente la trace fluorescente en vue de face.

15 L'invention permet d'adapter l'extraction du signal spécifique aux conditions d'expériences. Par exemple, si la cuve a bougé entre deux séries de mesures, il est possible, par analyse automatique de l'image, de repositionner les régions d'intérêt de
20 manière automatique, opération impossible à effectuer avec un système statique.

Exemples de réalisation de l'invention

25 Les trois exemples de réalisation décrits ci-dessous correspondent respectivement aux trois modes de réalisation définis précédemment.

30 Dans un premier exemple de réalisation illustré sur la figure 8, une source lumineuse 40, par exemple un laser ou une diode électroluminescente, excite, dans une cuve 41, le liquide contenant des molécules fluorescentes au travers d'optiques de mise

en forme non représentées, et de divers accessoires tels qu'un obturateur 42, et un diaphragme 43. Un premier objectif 44, disposé par exemple perpendiculairement à la direction principale du faisceau lumineux, collecte une partie de ce faisceau lumineux, émis par les molécules fluorescentes dans la cuve 41. Un filtre d'arrêt 45 est disposé derrière le premier objectif 44, juste devant un second objectif 46. L'association des objectifs 44 et 46 permet de former une image de la cuve 41 sur le détecteur d'image 47 qui est relié à un système de commande et de contrôle 49. Pour une cuve 41 d'une largeur intérieure de 1 cm, ce détecteur 47 peut être un détecteur de 512 x 512 pixels de 10 μ m de côté. Le premier objectif 44 peut avoir une focale 50 mm et le second objectif 46 une focale 25 mm.

Dans un second exemple de réalisation, illustré sur la figure 9, dont la configuration est la même que celle de la figure 8 pour l'excitation, on n'utilise qu'un seul détecteur. Une matrice à transparence variable 56, qui peut être une matrice à cristaux liquide ou une matrice de micro-miroirs, joue le rôle d'un diaphragme de champ. La matrice 56 peut être remplacée par une fente mobile actionnée par un actuateur mécanique ou électro-mécanique, par exemple, un électro-aimant ou un moteur électrique.

Dans un troisième exemple de réalisation illustré sur la figure 10, la configuration pour exciter l'intérieur de la cuve 41 est la même que pour la figure 8 et la configuration pour la collection de lumière est la même que pour celle de la figure 9. Deux

mono-détecteurs 50 et 51, par exemple des photo-
multiplicateurs décalés, permettent d'observer deux
régions différents de la cuve 41. Devant chaque
détecteur 50 et 51, une optique de reprise 52 et 53
5 permet de former l'image de la région d'intérêt sur un
diaphragme de champ 54 et 55 qui limite la région
observée. Un filtre d'arrêt peut être disposé avant,
dans ou derrière le diaphragme. La zone 56 représente
la trace fluorescente.

10

REFERENCES

- 5 [1] "Some applications of near-ultraviolet laser-induced fluorescence detection in nanomolar- and subnanomolar-range high-performance liquid chromatography or micro-high performance liquid chromatography" de N. Siméon, R. Myers, C. Bayle, M. Nertz, J.K. Stewart, F. Couderc (2001, Journal of Chromatography A, Vol 913, I 1-2, pages 253-259).
- 10
- [2] "Performance of an integrated microoptical system for fluorescence detection in microfluidic systems" de J.C. Roulet, R. Volkel, H.P. Herzig, E. Verpoorte, N.F. Rooij, R. Dandliker (2002, Analytical Chemistry, Vol. 74 (14), pages 3400-3407).
- 15
- [3] "Single molecule detection of specific nucleic acid sequences in unamplified genomic DNA" de A. Castro, et J.G. Williams (1997, Analytical chemistry, Vol. 69 (19), pages 3915-3920).
- 20

REVENDICATIONS

1. Procédé de dosage d'un échantillon biologique ou chimique, comportant une étape d'éclairement de l'échantillon (10) au moyen d'un faisceau lumineux (17) issu d'une source (11),
- 5 caractérisé en ce qu'il comporte, en outre, les étapes suivantes :
- réalisation d'une image comprenant
 - 10 l'image du faisceau (18) diffusé par l'échantillon (10),
 - analyse de l'image selon des critères de référence,
 - extraction d'une information spécifique à
 - 15 l'interaction faisceau lumineux/échantillon,
 - calcul du dosage.
2. Procédé selon la revendication 1, qui comporte une étape préalable d'introduction de
- 20 l'échantillon (10) dans une cuve (12) dont toutes les faces sont transparentes.
3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la diffusion est une diffusion Raman, une
- 25 diffusion par fluorescence, une diffusion moléculaire ou particulaire.
4. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'analyse consiste en l'étude de la structure
- 30 spatiale de l'image et de la distribution de l'énergie lumineuse dans cette image.

5. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le calcul du dosage se fait par rapport à un étalonnage entre la mesure d'énergie lumineuse et la concentration ou la quantité d'échantillon.

6. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le calcul du dosage se fait par rapport à l'analyse de la cinétique de la réaction biologique ou chimique.

7. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on définit une première zone d'intérêt (25) autour de la zone de volume excité, et une seconde zone d'intérêt (26) disposée à côté de cette première zone, et on mesure le signal spécifique en réalisant la soustraction entre la somme de tous les pixels de la première zone (25) et la somme de tous les pixels de la seconde zone (26).

8. Dispositif de dosage d'un échantillon biologique ou chimique comportant une cuve (12), dont toutes les faces sont transparentes, contenant ledit échantillon (10) éclairé par un faisceau lumineux (17) issu d'une source (11), caractérisé en ce qu'il comporte, en outre, des moyens optiques délivrant un signal-image de l'interaction faisceau lumineux/échantillon, un dispositif d'enregistrement de la structure spatiale de cette image (15), et des moyens de traitement (16).

9. Dispositif selon la revendication 8, dans lequel la section de la cuve (12) est rectangulaire, carrée, cylindrique ou elliptique.

5 10. Dispositif selon la revendication 8, dans lequel la source (11) est un laser à gaz, un laser solide, une diode laser, une diode électroluminescente, une diode organique ou une lampe spectrale.

10 11. Dispositif selon la revendication 10, dans lequel la lampe spectrale est une lampe halogène, à mercure, à xénon ou à deutérium.

15 12. Dispositif selon la revendication 8, dans lequel, le dispositif d'enregistrement de la structure spatiale (15) est une caméra CCD ou un système à balayage.

20 13. Dispositif selon la revendication 8, dans lequel les moyens optiques (13) comprennent un système d'objectif muni d'un filtre d'arrêt.

25 14. Dispositif selon la revendication 8 dans lequel le dispositif d'enregistrement de la structure spatiale comprend un mono-détecteur associé à une matrice de pixels à transparence programmable (56).

30 15. Dispositif selon la revendication 8, dans lequel le dispositif d'enregistrement de la structure spatiale comporte deux mono-détecteurs (50, 51).

16. Application du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 à la fluorescence.

5

FIG. 1

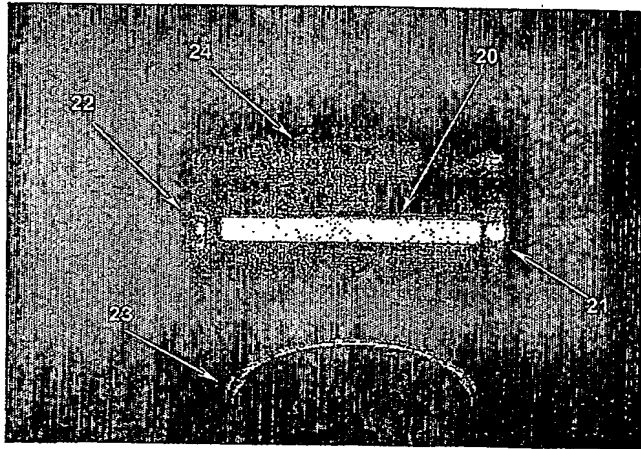
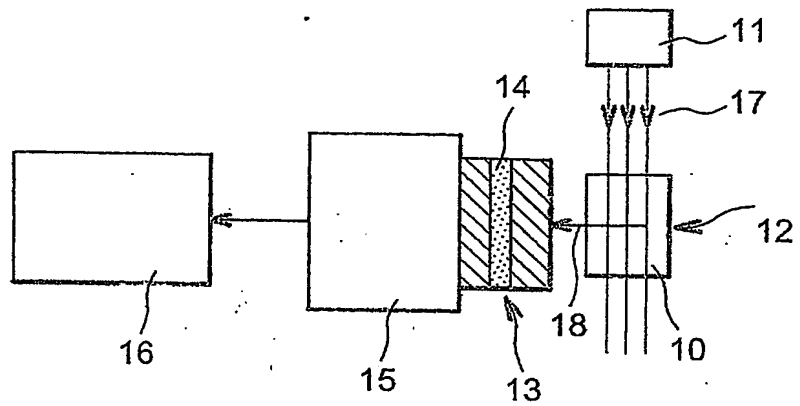
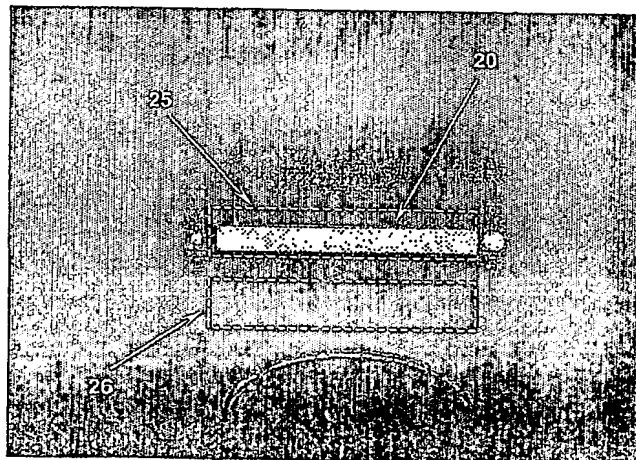


FIG. 2

FIG. 3



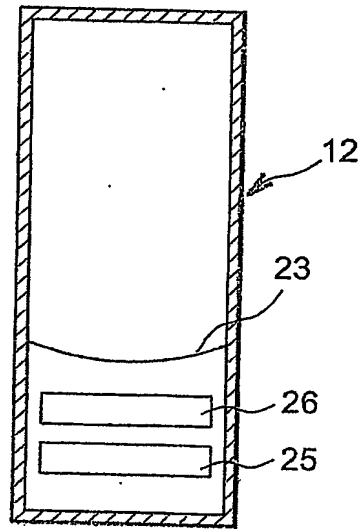


FIG. 4

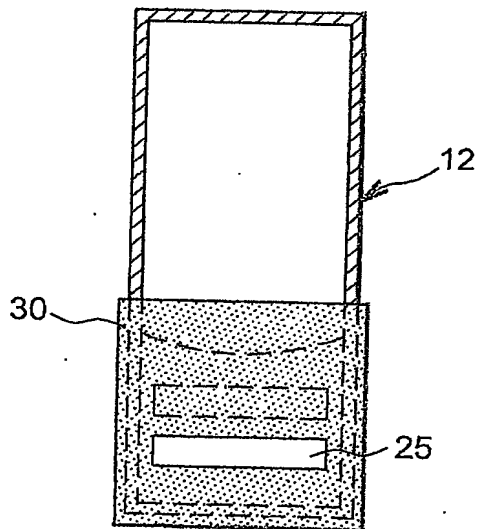


FIG. 5

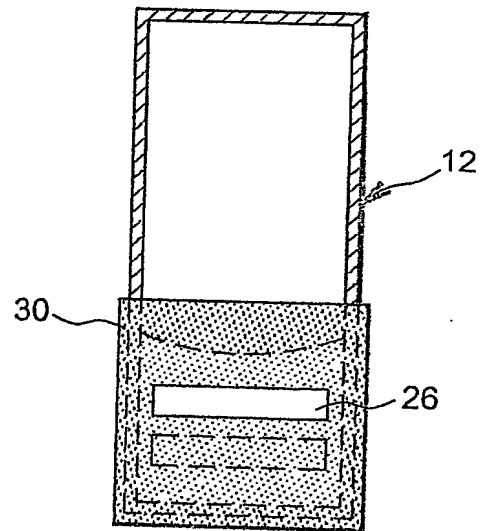


FIG. 6

3 / 4

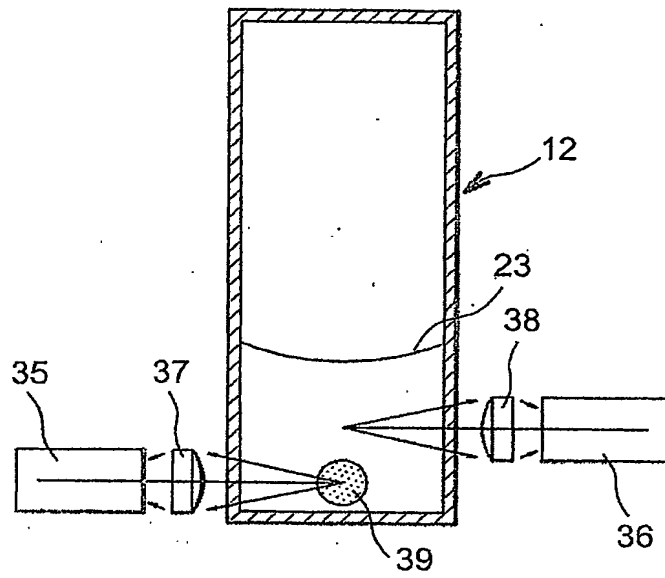


FIG. 7

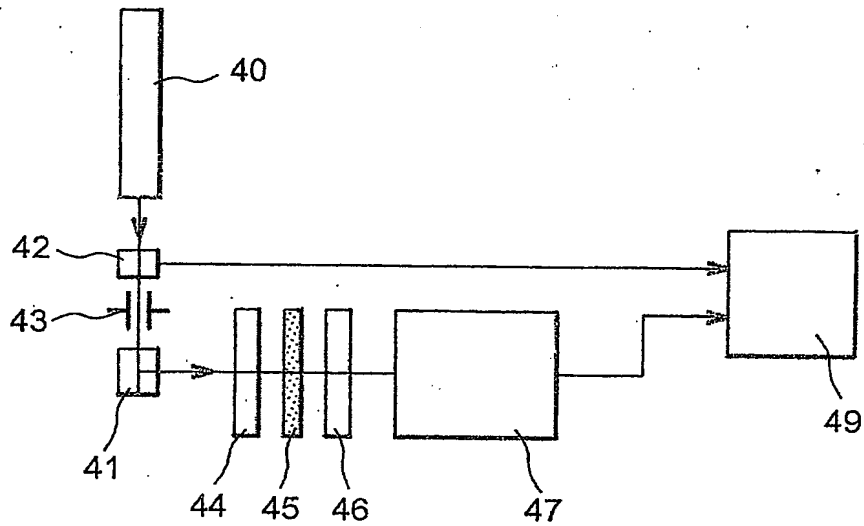


FIG. 8

4 / 4

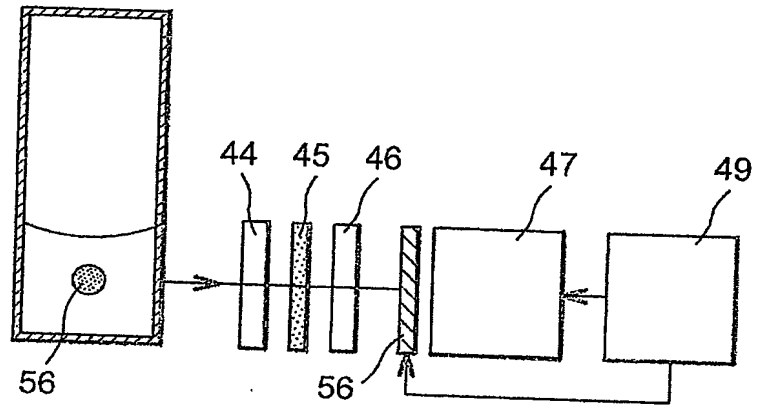


FIG. 9

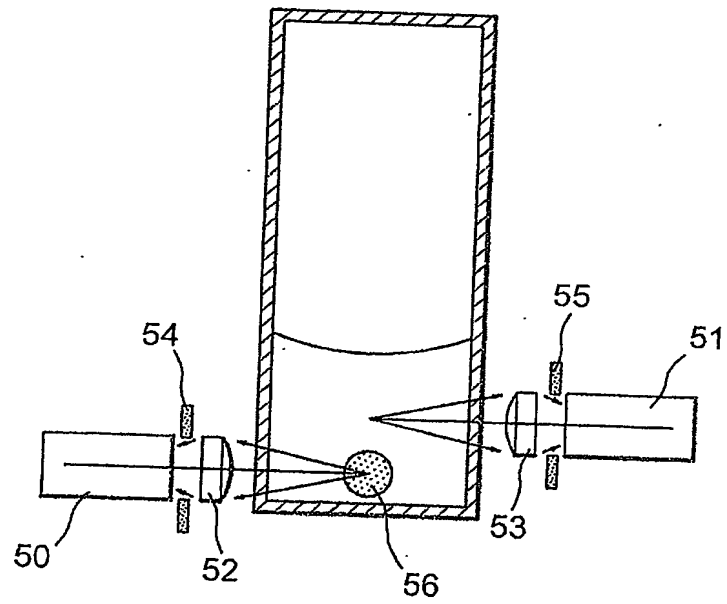


FIG. 10



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Désignation de l'inventeur

Vos références pour ce dossier	B 14352.3 DB DD2521
N°D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0350270
TITRE DE L'INVENTION	
	PROCEDE ET DISPOSITIF DE DOSAGE D'UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE OU CHIMIQUE
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	PERRAUT
Prénoms	François
Rue	En Rivière
Code postal et ville	38134 SAINT-JOSEPH DE RIVIERE - FRANCE
Société d'appartenance	
Inventeur 2	
Nom	SCHULTZ
Prénoms	Emmanuelle
Rue	10 bis, rue de Bellevue
Code postal et ville	38120 SAINT-EGREVE - FRANCE
Société d'appartenance	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Signé par

Signataire: FR, Brevatome, J. Lehu

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)

PCT/FR2004/050289



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.